

6

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-090628

(43)Date of publication of application : 27.03.2002

(51)Int.Cl.

G02B 21/00

(21)Application number : 2000-282695

(71)Applicant : OLYMPUS OPTICAL CO LTD

(22)Date of filing : 18.09.2000

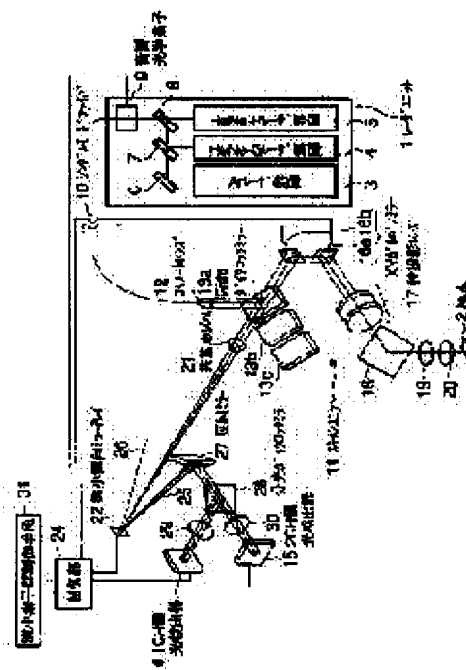
(72)Inventor : SASAKI HIROSHI

(54) CONFOCAL MICROSCOPE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To prevent mechanical wear of driving part and to realize high-speed action of a confocal pinhole.

SOLUTION: A microdeflection mirror array 22, constituted by arraying plural microdeflection mirrors 23 in a two-dimensional matrix is arranged at a position conjugate to a sample 2. In the mirror array 22, the angle of the mirror 23 in the light area of fluorescence is controlled, so that the fluorescence is reflected in the arranging direction of 1CH side and 2CH side photodetectors 14 and 15, and the angle of each of the mirrors 23 other than the light area of the fluorescence is controlled to be different from the angle of the mirror 23 in the light area.



1055090 (6)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-90628

(P2002-90628A)

(43) 公開日 平成14年3月27日 (2002.3.27)

(51) Int.Cl.⁷

G 0 2 B 21/00

識別記号

F I

G 0 2 B 21/00

テームト* (参考)

2 H 0 5 2

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2000-282695(P2000-282695)

(22) 出願日 平成12年9月18日 (2000.9.18)

(71) 出願人 000000376

オリンパス光学工業株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

(72) 発明者 佐々木 浩

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ
ンパス光学工業株式会社内

(74) 代理人 100058479

弁理士 鈴江 武彦 (外4名)

Fターム(参考) 2H052 AA08 AA09 AC04 AC15 AC34

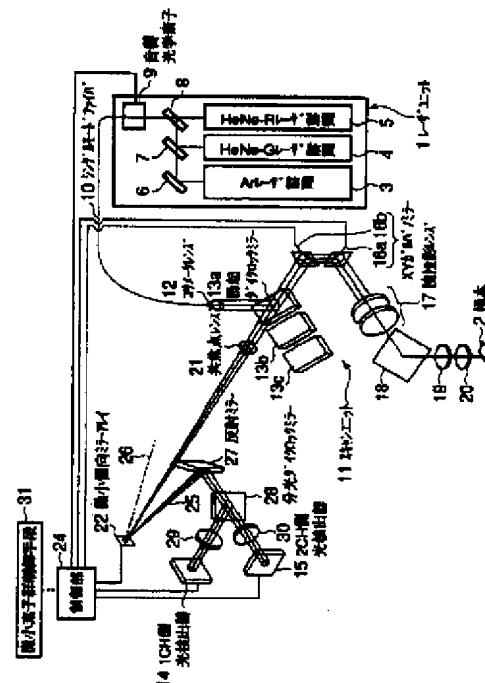
AD31 AD36 AF02

(54) 【発明の名称】 共焦点顕微鏡

(57) 【要約】

【課題】 駆動部の機械的な摩耗が生ぜず、かつ共焦点ピンホールの作用の高速化を実現する。

【解決手段】 複数の微小偏向ミラー23を2次元マトリックス状に配列して構成した微小偏向ミラーアレイ22を標本2の共役の位置に配置し、この微小偏向ミラーアレイ22において、蛍光を1CH側及び2CH側光検出器14、15の配置方向に反射するように蛍光の光領域内における各微小偏向ミラー23の角度を制御し、かつ蛍光の光領域外における各微小偏向ミラー23の角度を上記光領域内における各微小偏向ミラー22の角度とは異なる角度に制御する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 標本からの光を共焦点レンズを通して光検出器により検出する共焦点顕微鏡において、前記共焦点レンズを介して前記標本と共役な位置に配置された複数の微小素子からなる微小素子群と、前記各微小素子に対してそれぞれ制御を行い、前記標本から前記共焦点レンズを通して前記微小素子群に結像する光スポットの回折径内となる前記各微小素子からの前記光を前記光検出器に導く微小素子群制御手段と、を具備したことを特徴とする共焦点顕微鏡。

【請求項 2】 前記微小素子群は、複数の微小偏向ミラーを 2 次元マトリックス状に配列して構成され、前記微小素子群制御手段は、前記光スポットを前記光検出器の配置方向に反射するように前記回折径内における前記各微小偏向ミラーの角度を制御し、かつ前記回折径外における前記各微小偏向ミラーの角度を前記回折径内における前記各微小偏向ミラーの角度とは異なる角度に制御する機能を有する、ことを特徴とする請求項 1 記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 3】 前記微小素子群制御手段は、前記微小素子群に結像される前記回折径の大きさに応じて、前記光スポットを前記光検出器に導くために制御する前記各微小素子の領域を可変する機能を有することを特徴とする請求項 1 記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 4】 前記微小素子群制御手段は、前記微小素子群に結像される前記光スポットの位置ずれに応じて、前記光スポットを前記光検出器に導くために制御する前記各微小素子の中心位置を補正する機能を有することを特徴とする請求項 1 記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 5】 前記標本と前記微小素子群との間に配置された少なくとも 1 つの光学素子の切り換えにより生じる前記微小素子群上における前記光スポットの位置ずれを補正する機能を有することを特徴とする請求項 4 記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 6】 前記共焦点顕微鏡は、2 種類以上の蛍光色素で染色された標本に対して各蛍光色素に対応する励起波長の励起光を選択的に出力できる光源と、前記光源から出力された励起光を走査する走査手段と、前記走査手段で走査した励起光を標本上に集光する対物レンズと、をさらに備えており、前記走査手段の走査に同期して前記標本に対して照射する励起光を切り換えることにより、各励起光に対応する夫々の蛍光を時分割で 1 つの微小素子群を介して検出して 1 つの画像を取得する場合に、前記微小素子群制御手段は、前記光源からの励起光の切り替えに同期して、前記共焦点レンズを通して前記微小素子群に結像する光スポットの回折径に前記光検出器に前記標本からの光を導く前記微小素子群の各微小素子を調整することを特徴とする請求項 1 記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 7】 前記微小素子群制御手段による励起光の

切り替えは、前記走査手段による往復走査の往路と復路の走査に夫々同期することを特徴とする請求項 6 記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 8】 前記微小素子群制御手段による励起光の切り替えは、前記走査手段による 1 フレーム毎の走査に同期することを特徴とする請求項 6 記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 9】 前記微小素子群制御手段による励起光の切り替えは、前記走査手段による 1 画素毎の走査に同期することを特徴とする請求項 6 記載の共焦点顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、標本に対して光を照射し、この標本からの光を共焦点レンズから回折径の有効範囲を制限する手段を通して光検出器により検出する共焦点顕微鏡に関する。

【0002】

【従来の技術】共焦点顕微鏡は、光を対物レンズにより集光してその光スポットを標本上に結ばせ、この標本からの光を光検出器で検出している。このような共焦点顕微鏡では、標本と共役な位置に共焦点ピンホール（回折径の有効範囲を制限する手段）を配置している。

【0003】この共焦点ピンホールは、例えば実開平 6-16927 号公報に記載されているように、そのピンホール径の大きさは標本からの光が共焦点ピンホール面に形成する回折径に合わせることでにより分解能と明るさを最適化している。つまり、使用する対物レンズや観察する波長に合わせて共焦点ピンホールの開口サイズ（ピンホール径の大きさ）を可変できるようになっている。

【0004】この共焦点ピンホールの開閉機構としては、例えば、上記実開平 6-16927 号公報に記載されているようにターレット上の同心円上に複数のピンホールを配置し、このターレットを回転させることにより行う方法、又は特開 2000-10152 号公報に記載されているように直動モータを用いて 2 組の V 形状からなる四角開口を連続的に移動可変することにより行う方法がある。

【0005】一方、蛍光を観察する共焦点顕微鏡では、例えば特開平 7-333508 号公報に記載されているように、観察する標本の励起波長や蛍光分光特性に応じて、標本への照明光と標本からの蛍光を分離するダイクロイックミラーの特性を切り換える必要がある。

【0006】このダイクロイックミラーを切り換えたときには、ダイクロイックミラーの取付け角度誤差や平行度の違いにより共焦点ピンホール面での結像位置がずれるので、光軸又は共焦点ピンホール位置を動かすことにより共焦点ピンホールの中心と結像位置とを補正する必要がある。

【0007】この補正方法としては、例えば、上記特開

平 7-333508 号公報に記載されているように、共焦点ピンホール自体を面内に移動させる 2つのモータを用いた十字動ステージ方式、又は特開平 8-271792 号公報に記載されているように 2枚の平行平板ガラスをモータにより回転させて光軸を動かすことにより結像位置と共焦点ピンホールの中心とを合わせる方式などがある。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 上記共焦点顕微鏡の共焦点ピンホールの大きさは、光学系により若干異なるものの例えば 100~200 μm 近辺と非常に小さく、その開閉機構及び位置補正機構には、機械的な遊びや伝達系の誤差が殆どない高精度なものが要求され、かつ駆動部の摩耗による劣化も許されない。又、対物レンズや観察波長に合わせて共焦点ピンホールを開閉したり、ダイクロイックミラーの切り換えに合わせて共焦点ピンホールの位置補正を行うようになる。

【0009】 しかしながら、このような高精度な開閉機構及び位置補正機構を実現することと、これら機構の動作速度を速めることの両方を実現することは困難である。

【0010】 そこで本発明は、駆動部の機械的な摩耗が生ぜず、かつ回折径を有効に制限する手段の径補正又は位置補正の高速化を実現できる共焦点顕微鏡を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】 請求項 1 記載による本発明は、標本からの光を共焦点レンズを通して光検出器により検出する共焦点顕微鏡において、前記共焦点レンズを介して前記標本と共役な位置に配置された複数の微小素子からなる微小素子群と、前記各微小素子に対してそれぞれ制御を行い、前記標本から前記共焦点レンズを通して前記微小素子群に結像する光スポットの回折径内となる前記各微小素子からの前記光を前記光検出器に導く微小素子群制御手段と、を具備したことを特徴とする共焦点顕微鏡である。

【0012】 請求項 2 記載による本発明は、請求項 1 記載の共焦点顕微鏡において、前記微小素子群は、複数の微小偏向ミラーを 2 次元マトリクス状に配列して構成され、前記微小素子群制御手段は、前記光スポットを前記光検出器の配置方向に反射するように前記回折径内における前記各微小偏向ミラーの角度を制御し、かつ前記回折径外における前記各微小偏向ミラーの角度を前記回折径内における前記各微小偏向ミラーの角度とは異なる角度に制御する機能を有することを特徴とする。

【0013】 請求項 3 記載による本発明は、請求項 1 記載の共焦点顕微鏡において、前記微小素子群制御手段は、前記微小素子群に結像される前記回折径の大きさに応じて、前記光スポットを前記光検出器に導くために制御する前記各微小素子の領域を可変する機能を有すること

を特徴とする。

【0014】 請求項 4 記載による本発明は、請求項 1 記載の共焦点顕微鏡において、前記微小素子群制御手段は、前記微小素子群に結像される前記光スポットの位置ずれに応じて、前記光スポットを前記光検出器に導くために制御する前記各微小素子の中心位置を補正する機能を有することを特徴とする。

【0015】 請求項 5 記載による本発明は、請求項 4 記載の共焦点顕微鏡において、前記標本と前記微小素子群との間に配置された少なくとも 1つの光学素子の切り換えにより生じる前記微小素子群上における前記光スポットの位置ずれを補正する機能を有することを特徴とする。

【0016】 請求項 6 記載による本発明は、請求項 1 記載の共焦点顕微鏡において、2種類以上の蛍光色素で染色された標本に対して各蛍光色素に対応する励起波長の励起光を選択的に出力できる光源と、前記光源から出力された励起光を走査する走査手段と、前記走査手段で走査した励起光を標本上に集光する対物レンズとをさらに備えており、前記光走査手段の走査に同期して前記標本に対して照射する励起光を切り替えることにより、各励起光に対応する夫々の蛍光を時分割で 1つの微小素子群を介して検出して 1つの画像を取得する場合に、前記微小素子群制御手段は、前記光源からの励起光の切り換えに同期して、前記共焦点レンズを通して前記微小素子群に結像する光スポットの回折径に前記光検出器に前記標本からの光を導く前記微小素子群の各微小素子を調整することを特徴とするものである。

【0017】 請求項 7 記載の本発明は、請求項 6 記載の共焦点顕微鏡であって、前記微小素子群制御手段による励起光の切り替えは、前記光走査手段による往復走査の往路と復路の走査に夫々同期することを特徴としたものである。

【0018】 請求項 8 記載の本発明は、請求項 6 記載の共焦点顕微鏡であって、前記微小素子群制御手段による励起光の切り替えは、前記光走査手段による 1フレーム毎の走査に同期することを特徴とするものである。

【0019】 請求項 9 記載の本発明は、請求項 6 記載の共焦点顕微鏡であって、前記微小素子群制御手段による励起光の切り替えは、前記光走査手段による 1画素毎の走査に同期することを特徴とするものである。

【0020】

【発明の実施の形態】 (1) 以下、本発明の第 1の実施の形態について図面を参照して説明する。

【0021】 図 1 は共焦点顕微鏡の構成図である。レーザユニット 1 は、蛍光色素で染色された標本 2 に対し、その励起波長の各レーザ光を出力するものである。このレーザユニット 1 は、励起波長 488 nm のレーザ光を発振する Ar レーザ装置 3 と、励起波長 543 nm のレーザを発振する HeNe-G レーザ装置 4 と、励起波長

633 nmのレーザ光を発振するHeNe-Rレーザ装置5と、ミラー6と、波長488 nmと波長543 nmとの2つの波長のレーザ光を合成するダイクロイックミラー7と、波長488 nmと波長543 nmと波長633 nmとの3つのレーザ光を合成するダイクロイックミラー8と、各波長488 nm、543 nm、633 nmのうち任意の波長のレーザ光を選択するための音響光学素子(AOTF)9とから構成されている。

【0022】このレーザユニット1から出力されるレーザ光、すなわち音響光学素子9により選択された励起波長のレーザ光は、シングルモードファイバ10を通してスキャンユニット11に導かれている。このシングルモードファイバ10の出射端にはコリメートレンズ12が配置され、シングルモードファイバ10から出射されたレーザ光が平行光に整形されるようになっている。

【0023】3つの励起ダイクロイックミラー13a、13b、13cは、それぞれ切り換えによりコリメートレンズ12により平行光に整形されたレーザ光の光路上に配置されるもので、レーザ光を反射し、かつ標本2からの蛍光を透過する特性を有するものである。具体的に励起ダイクロイックミラー13aは各励起波長488 nm、543 nm、633 nmのレーザ光を反射し、かつこれらレーザ光により励起された標本2からの蛍光を透過するものであり、励起ダイクロイックミラー13bは励起波長488 nmのレーザ光を反射し、この励起波長488 nmよりも長い波長の光を透過する特性を有し、励起ダイクロイックミラー13cは励起波長543 nmのレーザ光を反射し、この励起波長543 nmよりも長い波長の光を透過する特性を有している。

【0024】従って、これら励起ダイクロイックミラー13a、13b、13cは、観察する標本2の種類により使い分けられ、例えば励起波長633 nmのレーザ光のみを用いて蛍光観察するとき、及び複数の励起波長を用いて多重蛍光観察するときには励起ダイクロイックミラー13aを使用する。又、励起波長488 nmのレーザ光のみを用いて蛍光観察するときには励起ダイクロイックミラー13bを使用する。又、励起波長543 nmのレーザ光のみを用いて蛍光観察するときには励起ダイクロイックミラー13cを使用する。これにより、後述する1CH側及び2CH側光検出器14、15での蛍光の取り込み効率を高くすることができる。

【0025】X・Yガルバノミラー16a、16bは、励起ダイクロイックミラー13a、13b又は13cの反射光路上に配置され、各励起波長488 nm、543 nm、633 nmの各レーザ光を標本2上の2次元方向(XY方向)に走査するためのものである。なお、Xガルバノミラー16aによりレーザ光を水平方向に走査し、Yガルバノミラー16bにより励起レーザ光を垂直方向に走査するものとなっている。

【0026】これらX・Yガルバノミラー16a、16

bの走査光路上には、瞳投影レンズ17、ミラー18、さらに結像レンズ19、対物レンズ20が配置され、これらを通して標本2上に光スポットを結ぶものとなっている。

【0027】標本2から発せられた蛍光は、上記照明光路とは逆方向、すなわち対物レンズ20から結像レンズ19、ミラー18、瞳投影レンズ17、X・Yガルバノミラー16a、16bに進み、励起ダイクロイックミラー13a、13b又は13cを透過して共焦点レンズ21に入射するものとなっている。

【0028】この共焦点レンズ21の結像位置、すなわち共焦点レンズ21を介して標本2と共役な位置には、微小素子群として微小偏向ミラーアレイ22が配置され、回折径を有効に制限する。この微小偏向ミラーアレイ22は、図2に示すように複数の微小偏向ミラー23を2次元マトリックス状に配列し、かつこれら微小偏向ミラー23の角度がそれぞれ可変自在に構成されている。

【0029】これら微小偏向ミラー23の角度制御は、例えば電磁石のオン・オフ作用により可変するものとなっている。この微小偏向ミラーアレイ22は、例えば半導体材料を用いた半導体プロセスによって製造されている。各微小偏向ミラー23の大きさは、それぞれ約10 μm角に形成されている。この微小偏向ミラーアレイ22は、マトリックス状に並んだ微小偏向ミラー22の充填率が90%以上と高いものである。

【0030】この微小偏向ミラーアレイ22は、後述する制御部24の制御により、共焦点レンズ21の結像により形成される標本2からの蛍光の光スポットを1CH側及び2CH側光検出器14、15の配置方向側の光路25上に反射するように、蛍光の光スポットの光領域内における各微小偏向ミラー23の角度が制御されるものとなっている。なお、この微小偏向ミラーアレイ22において蛍光の光スポットの光領域外の各微小偏向ミラー23は、蛍光の光スポットの光領域内における各微小偏向ミラー23の角度とは異なる角度に制御され、その反射方向は例えば光路26となっている。

【0031】微小偏向ミラーアレイ22で反射した蛍光の光路25上には、反射ミラー27が配置され、この反射ミラー27の反射光路上に分光ダイクロイックミラー28が配置されている。この分光ダイクロイックミラー28は、例えば波長570 nmより短い波長の蛍光(励起波長488 nmの励起で取得された蛍光)と、波長570 nmより長い波長の蛍光(励起波長543 nm又は633 nmの励起で取得された蛍光)とに分ける特性を有している。

【0032】この分光ダイクロイックミラー28の反射光路(波長570 nmより短い波長の蛍光)上には、レーザ光の反射光をカットして測定のために取り込む蛍光の波長領域を設定するバリアフィルタ29を介して上記

1CH側光検出器14が配置され、かつ透過光路（波長570nmより長い波長の蛍光）上には、レーザ光の反射光をカットして測定のために取り込む蛍光の波長領域を設定するバリアフィルタ30を介して上記2CH側光検出器15が配置されている。

【0033】上記制御部24は、レーザユニット1からArレーザ装置3、HeNe-Gレーザ装置4又はHeNe-Rレーザ装置5を選択し、X・Yガルバノミラー16a、16bを走査駆動し、例えば蛍光色素FITCからの蛍光を取り込んだ1CH側光検出器14から出力される信号と例えば蛍光色素Cy5からの蛍光を取り込んだ2CH側光検出器15から出力される信号とを色分けし、例えばモニターに1つの多重染色蛍光画像として表示する機能を有している。

【0034】又、制御部24は、標本2からの蛍光を1CH側及び2CH側光検出器14、15の配置方向となる光路25上に反射するように、微小偏向ミラーアレイ22における蛍光の光スポットの光領域内における各微小偏向ミラー23の角度を制御し、かつ蛍光の光スポットの光領域外における各微小偏向ミラー23の角度を1CH側及び2CH側光検出器14、15の配置方向とは異なる光路26上に反射するように各微小偏向ミラー23の角度を制御する微小素子群制御手段31としての機能を有している。

【0035】次に、上記の如く構成された共焦点顕微鏡の作用について説明する。

【0036】まず、制御部24は、レーザユニット1の音響光学素子9に例えばArレーザ装置3の選択指令を発する。この音響光学素子9は、Arレーザ装置3、HeNe-Gレーザ装置4又はHeNe-Rレーザ装置5のうちArレーザ装置3から出力される励起波長488nmのレーザ光を選択し、シングルモードファイバ10に導く。

【0037】この励起波長488nmのレーザ光は、シングルモードファイバ10を伝送してスキャンユニット11に導かれる。そして、このレーザ光は、コリメータレンズ12により平行光に整形され、励起ダイクロイックミラー13aにより反射され、X・Yガルバノミラ

$$\begin{aligned}\phi D &= 1.22 \cdot \lambda / NA \\ &= 1.22 \times 0.52 / 0.0063 \\ &= 100 \mu m\end{aligned}$$

従って、上記微小素子群制御手段31は、図3に示すように微小偏向ミラーアレイ22上において上記式(1)の算出により求められた結像されるべき蛍光の光スポットの回折径 $\phi D = 100 \mu m$ 内（図3では領域Q1内）にある各微小偏向ミラー23の角度を制御し、これら微小偏向ミラー23で反射した標本2からの蛍光が1CH側又は2CH側光検出器14、15の配置方向の光路25上に進行するようにする。なお、図3中では領域Q1内の各微小偏向ミラー23を「a」として示している。

*-16a、16bにより走査され、さらに瞳投影レンズ17を透過し、ミラー18で下方に反射され、結像レンズ19、対物レンズ20を通して標本2上に光スポットとして結像される。

【0038】このとき光スポットは、X・Yガルバノミラー16a、16bのXガルバノミラー16aにより水平方向に往復走査され、次にYガルバノミラー16bにより垂直方向に1画素分走査され、再びXガルバノミラー16aにより水平方向に往復走査されることが繰り返される。

【0039】このように標本2上に走査されたときに発生する蛍光色素FITCによる中心波長520nmの蛍光は、上記照明光路とは逆方向、すなわち対物レンズ20から結像レンズ19、ミラー18、瞳投影レンズ17、X・Yガルバノミラー16a、16bに進み、励起ダイクロイックミラー13aを透過して共焦点レンズ21に入射する。そして、蛍光は、共焦点レンズ21により集光されて微小偏向ミラーアレイ22上に光スポットとして結像する。

【0040】上記制御部24の微小素子群制御手段31は、上記Arレーザ装置3を選択すると共に、標本2からの蛍光を1CH側及び2CH側光検出器14、15の配置方向となる光路25上に反射するように、微小偏向ミラーアレイ22において結像される蛍光の光スポットの光領域内における各微小偏向ミラー23の角度を制御し、かつ蛍光の光スポットの光領域外における各微小偏向ミラー23の角度を1CH側及び2CH側光検出器14、15の配置方向とは異なる光路26上に反射するように各微小偏向ミラー23の角度を制御する。

【0041】ここで、共焦点レンズ21から微小偏向ミラーアレイ22に集光する蛍光のNAが0.0063で、励起波長488nmのレーザ光により蛍光色素FITCが励起されて蛍光波長520nmの蛍光を発するものとする、微小偏向ミラーアレイ22上での光スポットの大きさ（回折径） ϕD は、下記式(1)を計算することにより求められる。

【0042】

…(1)

【0043】これと共に微小素子群制御手段31は、微小偏向ミラーアレイ22における上記領域Q1外にある各微小偏向ミラー23の角度を、上記領域Q1内の各微小偏向ミラー23の角度とは異なる角度に制御し、これら微小偏向ミラー23で反射した光が1CH側又は2CH側光検出器14、15の配置方向から外れた光路26上に進行するようにする。

【0044】図4は各微小偏向ミラー23に結像される蛍光のスポット光の経路を蛍光が反射する面内で示した

側断面図である。上記光スポットの回折径 ϕD ($=100\mu\text{m}$)内(領域Q1内)における各微小偏向ミラー23-1~23-11は、蛍光の光スポットが光路25上に進行する方向に角度が制御され、上記光スポットの回折径 ϕD 外にある各微小偏向ミラー23-12~23-15は、光が光路26上に進行する方向に角度が制御されている。

【0045】以上のような微小偏向ミラーアレイ22での各微小偏向ミラー23の角度設定により、標本2のピンポイント面からの蛍光の光スポットは、上記光スポットの回折径 ϕD 内となる各微小偏向ミラー23-1~23-11で反射して光路25上に進行し、さらに反射ミラー27で反射して分光ダイクロイックミラー28に入射する。これにより、微小偏向ミラーアレイ22は、反射型の共焦点ピンホールとして作用する。

【0046】これと共に各微小偏向ミラー23-1~23-11以外の各微小偏向ミラー23-12~23-15で反射した光、すなわち標本2のピンポイント面から外れた面(デフォーカス面)からの光は、光路26上に進行して1CH側又は2CH側光検出器14, 15に入射しない。

【0047】上記分光ダイクロイックミラー28に入射した蛍光色素FITCの蛍光は、ここで反射され、バリアフィルタ29により不要なレーザ反射光がカットされ、FITCの蛍光のみが1CH側光検出器14に入射する。

【0048】制御部24は、1CH側光検出器14からの信号を取り込み、最終的に標本2の蛍光画像を取得する。

【0049】一方、共焦点効果を多少犠牲にしても、明るさ優先で共焦点ピンホール径を大きくしたい場合、例えば上記回折径 ϕD ($=100\mu\text{m}$)の2倍の共焦点ピンホール径 $200\mu\text{m}$ に設定したい場合は、図3に示すように領域Q2内にある各微小偏向ミラー23の角度を制御し、これら微小偏向ミラー23で反射した標本2からの蛍光が1CH側又は2CH側光検出器14, 15の配置方向の光路25上に進行するようにする。すなわち、図3で各微小偏向ミラー「a」「e」の角度を蛍光が光路25上に進行する方向に制御する。

【0050】このような微小偏向ミラーアレイ22における各微小偏向ミラー23の角度設定により、標本2のピンポイント面からの蛍光の光スポットは、Q2 ($=200\mu\text{m}$)内にある各微小偏向ミラー23で反射して光路25上に進行し、さらに反射ミラー27で反射して分光ダイクロイックミラー28に入射する。これにより、微小偏向ミラーアレイ22は、反射型の共焦点ピンホールとして作用する。

【0051】これと共にQ2 ($=200\mu\text{m}$)外における各微小偏向ミラー23で反射した光は、光路26上に進行して1CH側又は2CH側光検出器14, 15に入

射しない。

【0052】上記分光ダイクロイックミラー28に入射した蛍光色素FITCの蛍光は、ここで反射され、バリアフィルタ29により不要なレーザ反射光がカットされ、FITCの蛍光のみが1CH側光検出器14に入射する。

【0053】制御部24は、1CH側光検出器14からの信号を取り込み、最終的に標本2の蛍光画像を取得する。

10 【0054】このように上記第1の実施の形態においては、複数の微小偏向ミラー23を2次元マトリックス状に配列して構成した微小偏向ミラーアレイ22を標本2の共役の位置に配置し、この微小偏向ミラーアレイ22において、蛍光を1CH側及び2CH側光検出器14, 15の配置方向に反射するように蛍光の光スポットの回折径 ϕD 内における各微小偏向ミラー23の角度を制御し、かつ蛍光の光スポットの回折径 ϕD 外における各微小偏向ミラー23の角度を上記光スポットの回折径 ϕD 内における各微小偏向ミラー23の角度とは異なる角度に制御するようにしたので、共焦点ピンホール径の大きさを切り換えるためのモータ等を動力源とした機械的な伝達機構を、半導体プロセスで製造した微小偏向ミラーアレイ22の角度切り換えに置き換えたものとなり、駆動部の機械的な摩擦が生ぜず、かつ回折径を有効に制限する手段の径補正又は位置補正の高速化を実現できる。

20 【0055】なお、上記第1の実施の形態では、各微小偏向ミラー23の大きさを $10\mu\text{m}$ 角としたが、各微小偏向ミラー23間の隙間による光量ロスを極力抑えたい場合には、共焦点レンズ21の焦点距離を長めに設定して微小偏向ミラーアレイ22上の光スポットを大きくし、かつ個々の微小偏向ミラー23の大きさをそれぞれ大きくすればよい。各微小偏向ミラー23間の隙間の寸法を一定とすると、個々の微小偏向ミラー23を大きくすれば光量利用の効率が向上する。

30 【0056】(2)次に、本発明の第2の実施の形態について説明する。なお、共焦点顕微鏡の構成は、上記図1と同一構成であるので、同図を参照して説明する。

40 【0057】この第2の実施の形態は、蛍光色素FITCとCy5とにより2重蛍光染色された標本2を観察する9に適用した共焦点顕微鏡である。

【0058】通常、蛍光色素FITCは励起波長488nmのレーザ光で励起されて中心波長520nmの蛍光を発生し、蛍光色素Cy5は励起波長633nmのレーザ光で励起して中心波長670nmの蛍光を発生する。ここでは、蛍光色素FITCとCy5とで二重染色された標本2を、高速で往復走査するXガルバノミラー16aを用いて2種類の蛍光を時分割で観察を行う。

50 【0059】詳述すると、この場合、Xガルバノミラー16aの往路の走査で蛍光色素FITCからの蛍光の検出を行い、復路の走査で蛍光色素Cy5からの蛍光の検

11

出を行うようにすることで2種類の蛍光を時分割で観察することができる。

【0060】この観察の概略を説明すると、Xガルバノミラー16aにより水平方向の走査を行い、Yガルバノミラー16bにより垂直方向の走査を行うものとする。このうちのXガルバノミラー16aによる水平方向での往復走査を行うときのその往路で1ライン上の各画素位置での蛍光色素FITCによる蛍光を1CH側光検出器14で検出し、復路で往路の1ラインと同一ライン上の各画素位置での蛍光色素Cy5による蛍光を2CH側光検出器15で検出する。次に、Yガルバノミラー16bにより標本2上にレーザ光を垂直方向に1画素分走査する。次に、上記同様にXガルバノミラー16aの往復走査においてその往路で蛍光色素FITCによる蛍光を1CH側光検出器14で検出し、復路で蛍光色素Cy5による蛍光を2CH側光検出器15で検出する。これらの走査と検出とを垂直方向に走査しながら繰り返すものとなる。

【0061】次に、蛍光色素FITCとCy5とにより2重蛍光染色された標本2を観察する方法について説明する。

【0062】先ず、制御部24は、X・Yガルバノミラー16a、16bを動作させるが、このX・Yガルバノミラー16a、16bによる走査が往路か復路かを判断し、往路であれば、レーザユニット1の音響光学素子9にArレーザ装置3の選択指令を発する。

【0063】この音響光学素子9は、Arレーザ装置3、HeNe-Gレーザ装置4又はHeNe-Rレーザ装置5のうちArレーザ装置3から出力される励起波長488nmのレーザ光を選択し、シングルモードファイバ10に導く。

【0064】この励起波長488nmのレーザ光は、シングルモードファイバー10を伝送してスキャンユニット11に導かれる。そして、このレーザ光は、コリメータレンズ12により平行光に整形され、励起ダイクロイックミラー13aにより反射され、Xガルバノミラー16aにより走査され、さらに瞳投影レンズ17を透過し、ミラー18で下方に反射され、結像レンズ19、対物レンズ20を通して標本2上に光スポットとして結像される。このとき光スポットは、標本2上の水平方向の往路方向に走査される。

【0065】このように標本2上に走査されたときに水平方向1ライン上の各画素に対応する点から発生する蛍光色素FITCによる中心波長520nmの蛍光は、上記照明光路とは逆方向、すなわち対物レンズ20から結像レンズ19、ミラー18、瞳投影レンズ17、X・Yガルバノミラー16a、16bに進み、励起ダイクロイックミラー13aを透過して共焦点レンズ21に入射する。そして、蛍光は、共焦点レンズ21により集光されて微小偏向ミラーアレイ22上に結像する。

12

【0066】上記制御部24の微小素子群制御手段31は、上記Arレーザ装置3を選択すると共に、標本2からの蛍光を1CH側光検出器14及び2CH側光検出器15の配置方向となる光路25上に反射するように、微小偏向ミラーアレイ22において結像される蛍光のスポット光の光領域内における各微小偏向ミラー23の角度を制御し、かつ蛍光のスポット光の光領域外における各微小偏向ミラー23の角度を1CH側光検出器14及び2CH側光検出器15の配置方向とは異なる光路26上に反射するように各微小偏向ミラー23の角度を制御する。

【0067】ここで、共焦点レンズ21から微小偏向ミラーアレイ22に集光する蛍光のNAが0.0063で、励起波長488nmのレーザ光により蛍光色素FITCが励起されて蛍光波長520nmの蛍光を発するので、微小偏向ミラーアレイ22上での光スポットの大きさ(回折径) ϕD は、上記の如く100 μm である。

【0068】従って、上記微小素子群制御手段31は、図5に示すように微小偏向ミラーアレイ22における光スポットの回折径 ϕD (=100 μm)内における領域Q1内の各微小偏向ミラー23の角度を制御し、これら微小偏向ミラー23で反射した標本2からの蛍光が1CH側光検出器14及び2CH側光検出器15の配置方向の光路25上に進行するようにする。なお、図5中では領域Q1内の微小偏向ミラー23を「a」として示している。

【0069】これと共に微小素子群制御手段31は、微小偏向ミラーアレイ22における光スポットの回折径 ϕD (=100 μm)外における各微小偏向ミラー23の角度を、上記光スポットの回折径 ϕD (=100 μm)内の各微小偏向ミラー23の角度とは異なる角度に制御し、これら微小偏向ミラー23で反射した光が1CH側光検出器14及び2CH側光検出器15の配置方向から外れた光路26上に進行するようにする。

【0070】このように標本2のピント面からの蛍光色素FITCの蛍光は、微小偏向ミラーアレイ22で反射して光路25上に進行し、さらに反射ミラー27で反射して分光ダイクロイックミラー28に入射する。

【0071】この分光ダイクロイックミラー28に入射した蛍光色素FITCの蛍光は、ここで反射され、バリアフィルタ29により不要なレーザ反射光がカットされ、FITCの蛍光のみが1CH側光検出器14に入射する。

【0072】そして、制御部24は、1CH側光検出器14からの信号を取り込む。なお、このとき制御部24は、分光ダイクロイックミラー28を透過する漏れ光を検出しないように2CH側光検出器15を電氣的に検出光を測定できない状態にしてあることが望ましい。

【0073】制御部24は、1CH側光検出器14による蛍光色素FITCの蛍光の取り込みを、Xガルバノミ

ラー16aによる水平方向の往路の走査毎に各画素行う。

【0074】次に、Xガルパノミラー16aによる復路に移ると、制御部24は、レーザユニット1の音響光学素子9にHeNe-Rレーザ装置5の選択指令を発し、このHeNe-Rレーザ装置5から励起波長633nmのレーザ光を選択出力してシングルモードファイバ10に導く。

【0075】この励起波長633nmのレーザ光は、シングルモードファイバ10を伝送してスキャンユニット11に導かれる。そして、このレーザ光は、コリメータレンズ12により平行光に整形され、励起ダイクロイックミラー13aにより反射され、Xガルパノミラー16aにより走査され、さらに瞳投影レンズ17を透過し、ミラー18で下方に反射され、結像レンズ19、対物レンズ20を通して標本2上に光スポットとして結像される。このとき光スポットは、標本2上の水平方向の復路方向に走査される。

【0076】このように標本2上に走査されたときに発生する蛍光色素Cy5による中心波長670nmの蛍光は、上記照明光路とは逆方向、すなわち対物レンズ20から結像レンズ19、ミラー18、瞳投影レンズ17、X・Yガルパノミラー16a、16bに進み、励起ダイクロイックミラー13aを透過して共焦点レンズ21に入射する。そして、蛍光は、共焦点レンズ21により集光されて微小偏向ミラーアレイ22上に結像する。

【0077】上記制御部24の微小素子群制御手段31は、上記HeNe-Rレーザ装置5を選択すると共に、標本2からの蛍光を1CH側光検出器14及び2CH側光検出器15の配置方向となる光路25上に反射するように、微小偏向ミラーアレイ22において結像される蛍光のスポット光の光領域内における各微小偏向ミラー23の角度を制御し、かつ蛍光のスポット光の光領域外における各微小偏向ミラー23の角度を1CH側光検出器14及び2CH側光検出器15の配置方向とは異なる光路26上に反射するように各微小偏向ミラー23の角度を制御する。

【0078】ここで、共焦点レンズ21から微小偏向ミラーアレイ22に集光する蛍光のNAが0.0063で、励起波長633nmのレーザ光により蛍光色素Cy5が励起されて蛍光波長670nmの蛍光を発するので、微小偏向ミラーアレイ22上での光スポットの大きさ(回折径) ϕD は、 $128\mu m$ となる。

【0079】従って、上記微小素子群制御手段31は、図5に示すように微小偏向ミラーアレイ22における光スポットの回折径 $\phi D (=128\mu m)$ 内における領域Q3内の各微小偏向ミラー23の角度を制御し、これら微小偏向ミラー23で反射した標本2からの蛍光が1CH側光検出器14及び2CH側光検出器15の配置方向の光路25上に進行するようにする。なお、図5中では

領域Q3内の微小偏向ミラー23を「a」「b」として示している。

【0080】これと共に微小素子群制御手段31は、微小偏向ミラーアレイ22における光スポットの回折径 $\phi D (=128\mu m)$ 外における各微小偏向ミラー23の角度を、上記光スポットの回折径 $\phi D (=128\mu m)$ 内の各微小偏向ミラー23の角度とは異なる角度に制御し、これら微小偏向ミラー23で反射した光が1CH側光検出器14及び2CH側光検出器15の配置方向から外れた光路26上に進行するようにする。

【0081】このように標本2のピント面からの蛍光色素Cy5の蛍光は、微小偏向ミラーアレイ22で反射して光路25上に進行し、さらに反射ミラー27で反射して分光ダイクロイックミラー28に入射する。

【0082】この分光ダイクロイックミラー28に入射した蛍光色素Cy5の蛍光は、ここで透過し、バリアフィルタ30により不要なレーザ反射光がカットされ、Cy5の蛍光のみが2CH側光検出器15に入射する。

【0083】そして、制御部24は、2CH側光検出器15からの信号を取り込む。なお、このとき制御部24は、分光ダイクロイックミラー28を反射する漏れ光を検出しないように1CH側光検出器14を電氣的に検出光を測定できない状態にすることが望ましい。

【0084】制御部24は、2CH側光検出器15による蛍光色素Cy5の蛍光の取り込みを、Xガルパノミラー16aによる水平方向の復路の走査毎に各画素行う。

【0085】これ以降、以上説明したのと同様に、Xガルパノミラー14aの走査による往路においてレーザ波長488nmを選択し、微小偏向ミラーアレイ22における光スポットの回折径 $\phi D (=100\mu m)$ 内における各微小偏向ミラー23の角度を制御し、1CH側光検出器14により蛍光色素FITCによる蛍光を検出し、復路においてレーザ波長633nmを選択し、微小偏向ミラーアレイ22における光スポットの回折径 $\phi D (=128\mu m)$ 内における各微小偏向ミラー23の角度を制御し、2CH側光検出器15により蛍光色素Cy5による蛍光を検出する。これらのレーザ波長選択と、微小偏向ミラーアレイ22における光スポットの回折径 ϕD 内における各微小偏向ミラー23の角度の制御と、1CH側又は2CH側検出器14、15の選択とを、Yガルパノミラー14bを走査しながら垂直方向の1画素毎に繰り返す。

【0086】そして、制御部24は、1CH側光検出器24から取り込んだ蛍光色素FITCによる信号と2CH側光検出器15から取り込んだ蛍光色素Cy5による信号とを色分けし、例えばモニターに1つの多重染色蛍光画像として表示する。

【0087】このように上記第2の実施の形態によれば、上記第1の実施の形態と同様に、共焦点ピンホール径の大きさを切り換えるためのモータ等を動力源とした

機械的な伝達機構を、半導体プロセスで製造した微小偏向ミラーアレイ22の角度切り換えに置き換えたものとなり、駆動部の機械的な摩擦が生ぜず、かつ回折径の有効範囲を制限する手段の径補正又は位置補正の高速化を実現できることは勿論のこと、蛍光色素FITCとCy5とにより2重蛍光染色された標本2を観察する場合に、Xガルバノミラー16aによる往路と復路との走査の切り換えによって、1CH側光検出器14でFITCの画像を取得し、2CH側光検出器15でCy5の画像を取得するので、2種の蛍光のクロストークを防止でき、かつ各蛍光波長において最適な回折径の設定ができる。

【0088】なお、Xガルバノミラー16aの走査周波数は500Hzと高速であり、各往路と復路における微小偏向ミラーアレイ22の設定範囲、すなわち図5に示す領域Q1とQ2との切り換え時間を水平方向1ラインの片道走査時間の1msecよりも十分に速い、100μsec以下で行うことが望ましい。

【0089】各微小偏向ミラー23は、質量が大変小さく、慣性が殆どないので、この切り換え速度に正確に対応することができる。なお、1CH側及び2CH側光検出器14、15の電気的な切り換え速度も十分に対応可能である。

【0090】上記第2の実施の形態は次の通り変形してもよい。

【0091】上記第2の実施の形態では、2つの1CH側及び2CH側光検出器14、15で各蛍光波長毎に検出しているが、1CH側又は2CH側光検出器14、15のうちいずれか一方の1つの光検出器で2つの蛍光を取得するようにしてもよい。その方法は、いずれか一方の光検出器、例えば1CH側光検出器14からの検出信号を制御部24において時分割に処理する、すなわちXガルバノミラー16aの水平走査の往路での検出信号を蛍光色素FITCの光信号として処理し、復路での検出信号を蛍光色素Cy5の光信号として処理することで実現できる。

【0092】このように制御部24において2つの蛍光を時分割で取得し、光検出器からの検出信号を各蛍光色素FITCとCy5とによる各蛍光毎に検出時間を分けて信号処理すれば、1つの光検出器で代用でき、検出器を節約できる。この場合、使用するバリアフィルタは、2つの励起波長488nm、633nm共にカットして、蛍光色素FITCとCy5との蛍光波長領域の両方を透過する特性を持たせる。

【0093】又、上記第2の実施の形態では、水平方向の往復走査を行うXガルバノミラー16aの往路で蛍光色素FITCの画像を取得し、復路で蛍光色素Cy5の画像を取得しているが、2種類の蛍光の取得画像の間に1msec程度の時間差を生じている。この時間差を問題とする場合は、蛍光色素FITCとCy5との切り換

えを水平ラインではなく、1画素(1点)走査中に行ってもよい。つまり、蛍光色素FITCとCy5との各観察に必要な設定である、励起波長を選択するための音響光学素子9による切り換え、微小偏向ミラーアレイ22において蛍光波長に合わせた回折径φD内の各微小偏向ミラー23の角度制御、検出しなない検出器を電氣的に測定できないようにするための1CH側又は2CH側光検出器14、15の切り換えを、標本2上の走査中の1点の光スポットに対応する1画素走査中に行えばよい。

【0094】以上の変形例を合わせた上記第2の実施の形態によれば、1つの画像を取得する間に2種類の蛍光波長を時分割で取得でき、かつそれぞれの蛍光波長に応じた最適な回折径(φD)を設定できるので、蛍光クロストークがなく波長毎に同一の共焦点効果が得られる。

【0095】(3)次に、本発明の第3の実施の形態について説明する。なお、図1と同一部分には同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

【0096】図6は共焦点顕微鏡の構成図である。この共焦点顕微鏡は、1つの光検出器14で蛍光色素FITCとPIとCy5の3つの蛍光を時分割で取得するものである。

【0097】蛍光色素PIを染色した標本2に対して励起波長543nmの励起レーザー光で励起すると、中心波長580nm付近の蛍光を発する。このとき、微小偏向ミラーアレイ22における蛍光色素PIによる蛍光のスポット光の回折径φDは、上記式(1)を用いて算出すると112μmとなる。

【0098】制御部24の微小素子群制御手段31は、蛍光色素FITC、PI、Cy5に3重染色された標本2の画像を取得する場合、1画素毎に、レーザーユニット1から先ずはArレーザー装置3を選択したときに微小偏向ミラーアレイ22における蛍光色素FITCによる蛍光のスポット光の回折径φD(=100μm)内の各微小偏向ミラー23の角度制御を行い、次にHeNe-Gレーザー装置4を選択したときに微小偏向ミラーアレイ22における蛍光色素PIによる蛍光のスポット光の回折径φD(=112μm)内の各微小偏向ミラー23の角度制御を行い、次にHeNe-Rレーザー装置5を選択したときに微小偏向ミラーアレイ22における蛍光色素Cy5による蛍光のスポット光の回折径φD(=128μm)内の各微小偏向ミラー23の角度制御を行う機能を有するものとなる。

【0099】そして、制御部24は、Arレーザー装置3、HeNe-Gレーザー装置4又はHeNe-Rレーザー装置5の選択に同期して、光検出器14からの信号を蛍光色素FITCによる信号として取り込んで蓄積し、次に光検出器14からの信号を蛍光色素PIによる信号として取り込んで蓄積し、次に光検出器14からの信号を蛍光色素Cy5による信号として取り込んで蓄積する機能を有している。そして、これらの動作をX・Yガルバ

ノミラー 16a、16b により走査しながら全ての画素について行う。そして、各画素毎に蓄積された蛍光色素 FITC、PI、Cy5 による各信号を色分けし、例えばモニターに 1 つの多重染色蛍光画像として表示する機能を有している。

【0100】なお、光検出器 14 の前方に配置するバリアフィルタ 30 は、3 つの励起波長 488 nm、543 nm、633 nm を全てカットすると共に、蛍光色素 FITC、PI、Cy5 により 3 つの蛍光の蛍光波長領域を透過させる特性を持たせたものである。又、このバリアフィルタ 30 は、励起波長 488 nm をカットして蛍光色素 FITC の蛍光波長を透過させる特性を持つ FITC 用バリアフィルタと、励起波長 543 nm をカットして蛍光色素 PI の蛍光波長を透過させる特性を持つ PI 用バリアフィルタと、励起波長 633 nm をカットして蛍光色素 Cy5 の蛍光波長を透過させる特性を持つ Cy5 用バリアフィルタとの 3 種類のバリアフィルタを、各蛍光の検出時間に同期させて電動式の機構により切り替えるようにしてもよい。

【0101】次に、上記の如く構成された共焦点顕微鏡を用いての蛍光色素 FITC、PI、Cy5 により 3 重蛍光染色された標本 2 を観察する方法について説明する。

【0102】まず、制御部 24 は、X・Y ガルバノミラー 16a、16b を駆動して最初の 1 画素に対応する標本 2 上の 1 点にスポット光が結像するように移動し、その後 X・Y ガルバノミラー 16a、16b を固定する。

【0103】次に、制御部 24 は、3 種類の蛍光色素 FITC、PI、Cy5 のうち FITC → PI → Cy5 の順序で測定することから、レーザユニット 1 の音響光学素子 9 に選択指令を発して Ar レーザ装置 3 を選択させ、この Ar レーザ装置 3 から励起波長 488 nm のレーザ光を出力させる。

【0104】この励起波長 488 nm のレーザ光は、シングルモードファイバー 10 を伝送してスキャンユニット 11 に導かれ、コリメータレンズ 12、励起ダイクロイックミラー 13a、X・Y ガルバノミラー 16a、16b、さらに瞳投影レンズ 17、ミラー 18、結像レンズ 19、対物レンズ 20 を通して標本 2 上に光スポットとして結像される。

【0105】この標本 2 からの蛍光色素 FITC による中心波長 520 nm の蛍光は、上記照明光路とは逆方向、すなわち対物レンズ 20 から結像レンズ 19、ミラー 18、瞳投影レンズ 17、X・Y ガルバノミラー 16a、16b に進み、励起ダイクロイックミラー 13a を透過して共焦点レンズ 21 に入射する。そして、蛍光は、共焦点レンズ 21 により集光されて微小偏向ミラーアレイ 22 上に結像する。

【0106】上記制御部 24 の微小素子群制御手段 31

は、上記 Ar レーザ装置 3 を選択すると共に、標本 2 からの蛍光を光検出器 14 の配置方向となる光路 25 上に反射するように、微小偏向ミラーアレイ 22 において結像される蛍光のスポット光の光領域内における各微小偏向ミラー 23 の角度を制御し、かつ蛍光のスポット光の光領域外における各微小偏向ミラー 23 の角度を光検出器 14 の配置方向とは異なる光路 26 上に反射するように各微小偏向ミラー 23 の角度を制御する。

【0107】ここで、共焦点レンズ 21 から微小偏向ミラーアレイ 22 に集光する蛍光の NA が 0.0063 で、励起波長 488 nm のレーザ光により蛍光色素 FITC が励起されて蛍光波長 520 nm の蛍光を発するので、微小偏向ミラーアレイ 22 上での光スポットの大きさ（回折径） ϕD は、上記の如く 100 μm である。

【0108】従って、上記微小素子群制御手段 31 は、上記図 5 に示すように微小偏向ミラーアレイ 22 における光スポットの回折径 ϕD (= 100 μm) 内における領域 Q1 内の各微小偏向ミラー 23 の角度を制御し、これら微小偏向ミラー 23 で反射した標本 2 からの蛍光が光検出器 14 の配置方向の光路 25 上に進行するようにする。

【0109】これと共に微小素子群制御手段 31 は、微小偏向ミラーアレイ 22 における光スポットの回折径 ϕD (= 100 μm) 外における各微小偏向ミラー 23 の角度を、上記光スポットの回折径 ϕD (= 100 μm) 内の各微小偏向ミラー 23 の角度とは異なる角度に制御し、これら微小偏向ミラー 23 で反射した光が光検出器 14 の配置方向から外れた光路 26 上に進行するようにする。

【0110】このように標本 2 のピント面からの蛍光色素 FITC の蛍光は、微小偏向ミラーアレイ 22 で反射して光路 25 上に進行し、さらに反射ミラー 27 で反射してバリアフィルタ 30 により不要なレーザ反射光がカットされ、FITC の蛍光が光検出器 14 に入射する。

【0111】そして、制御部 24 は、光検出器 14 からの信号を蛍光色素 FITC の蛍光の信号として取り込んで蓄積する。

【0112】次に、制御部 24 は、1 画素に対して 3 種類の蛍光色素 FITC、PI、Cy5 の全ての蛍光の検出が終了したかを判断し、3 種類全ての蛍光検出が終了していなければ、次に蛍光測定する蛍光色素 FITC、PI 又は Cy5 を判断する。

【0113】この判断の結果、制御部 24 は、同一画素上において、レーザユニット 1 の音響光学素子 9 に選択指令を発して HeNe-G レーザ装置 4 を選択させ、この HeNe-G レーザ装置 4 から励起波長 543 nm のレーザ光を出力させる。

【0114】この励起波長 543 nm のレーザ光は、シングルモードファイバー 10 を伝送してスキャンユニット 11 に導かれ、コリメータレンズ 12、励起ダイクロ

イックミラー 13、X・Yガルバノミラー 16a、16b、さらに瞳投影レンズ 17、ミラー 18、結像レンズ 19、対物レンズ 20 を通して標本 2 上に光スポットとして結像される。

【0115】この標本 2 からの蛍光色素 PI による中心波長 590nm の蛍光は、上記照明光路とは逆方向、すなわち対物レンズ 20 から結像レンズ 19、ミラー 18、瞳投影レンズ 17、X・Yガルバノミラー 16a、16b に進み、励起ダイクロイックミラー 13a を透過して共焦点レンズ 21 に入射する。そして、蛍光は、共焦点レンズ 21 により集光されて微小偏向ミラーアレイ 22 上に結像する。

【0116】上記制御部 24 の微小素子群制御手段 31 は、上記 HeNe-R レーザ装置 4 を選択すると共に、標本 2 からの蛍光を光検出器 14 の配置方向となる光路 25 上に反射するように、微小偏向ミラーアレイ 22 において結像される蛍光のスポット光の光領域内における各微小偏向ミラー 23 の角度を制御し、かつ蛍光のスポット光の光領域外における各微小偏向ミラー 23 の角度を光検出器 14 の配置方向とは異なる光路 26 上に反射するように各微小偏向ミラー 23 の角度を制御する。

【0117】ここで、微小偏向ミラーアレイ 22 における蛍光色素 PI による蛍光のスポット光の回折径 ϕD は、上記の如く $112\mu m$ である。

【0118】従って、上記微小素子群制御手段 31 は、微小偏向ミラーアレイ 22 における光スポットの回折径 $\phi D (=112\mu m)$ 内における領域内の各微小偏向ミラー 23 の角度を制御し、これら微小偏向ミラー 23 で反射した標本 2 からの蛍光が光検出器 14 の配置方向の光路 25 上に進行するようにする。

【0119】これと共に微小素子群制御手段 31 は、微小偏向ミラーアレイ 22 における光スポットの回折径 $\phi D (=112\mu m)$ 外における各微小偏向ミラー 23 の角度を、上記光スポットの回折径 $\phi D (=112\mu m)$ 内の各微小偏向ミラー 23 の角度とは異なる角度に制御し、これら微小偏向ミラー 23 で反射した光が光検出器 14 の配置方向から外れた光路 26 上に進行するようにする。

【0120】このように標本 2 のピント面からの蛍光色素 PI の蛍光は、微小偏向ミラーアレイ 22 で反射して光路 25 上に進行し、さらに反射ミラー 27 で反射してバリアフィルタ 30 により不要なレーザ反射光がカットされ、PI の蛍光が光検出器 14 に入射する。

【0121】そして、制御部 24 は、光検出器 14 からの信号を蛍光色素 PI の蛍光の信号として取り込んで蓄積する。

【0122】次に、制御部 24 は、再び 1 画素に対して 3 種類の蛍光色素 FITC、PI、Cy5 の全ての蛍光の検出が終了したかを判断し、3 種類全ての蛍光検出が終了していなければ、次に蛍光測定する蛍光色素 FITC

C、PI 又は Cy5 を判断する。

【0123】この判断の結果、制御部 24 は、同一画素上において、レーザユニット 1 の音響光学素子 9 に選択指令を発して HeNe-R レーザ装置 5 を選択させ、この HeNe-R レーザ装置 5 から励起波長 633nm のレーザ光を出力させる。

【0124】この励起波長 633nm のレーザ光は、シングルモードファイバー 10 を伝送してスキャンユニット 11 に導かれ、コリメータレンズ 12、励起ダイクロイックミラー 13、X・Yガルバノミラー 16a、16b、さらに瞳投影レンズ 17、ミラー 18、結像レンズ 19、対物レンズ 20 を通して標本 2 上に光スポットとして結像される。

【0125】この標本 2 からの蛍光色素 Cy5 による中心波長 670nm の蛍光は、上記照明光路とは逆方向、すなわち対物レンズ 20 から結像レンズ 19、ミラー 18、瞳投影レンズ 17、X・Yガルバノミラー 16a、16b に進み、励起ダイクロイックミラー 13a を透過して共焦点レンズ 21 に入射する。そして、蛍光は、共焦点レンズ 21 により集光されて微小偏向ミラーアレイ 22 上に結像する。

【0126】上記制御部 24 の微小素子群制御手段 31 は、上記 HeNe-R レーザ装置 5 を選択すると共に、標本 2 からの蛍光を光検出器 14 の配置方向となる光路 25 上に反射するように、微小偏向ミラーアレイ 22 において結像される蛍光のスポット光の光領域内における各微小偏向ミラー 23 の角度を制御し、かつ蛍光のスポット光の光領域外における各微小偏向ミラー 23 の角度を光検出器 14 の配置方向とは異なる光路 26 上に反射するように各微小偏向ミラー 23 の角度を制御する。

【0127】ここで、微小偏向ミラーアレイ 22 における蛍光色素 Cy5 による蛍光のスポット光の回折径 ϕD は、上記の如く $128\mu m$ である。

【0128】従って、上記微小素子群制御手段 31 は、微小偏向ミラーアレイ 22 における光スポットの回折径 $\phi D (=128\mu m)$ 内における領域内の各微小偏向ミラー 23 の角度を制御し、これら微小偏向ミラー 23 で反射した標本 2 からの蛍光が光検出器 14 の配置方向の光路 25 上に進行するようにする。

【0129】これと共に微小素子群制御手段 31 は、微小偏向ミラーアレイ 22 における光スポットの回折径 $\phi D (=128\mu m)$ 外における各微小偏向ミラー 23 の角度を、上記光スポットの回折径 $\phi D (=128\mu m)$ 内の各微小偏向ミラー 23 の角度とは異なる角度に制御し、これら微小偏向ミラー 23 で反射した光が光検出器 14 の配置方向から外れた光路 26 上に進行するようにする。

【0130】このように標本 2 のピント面からの蛍光色素 Cy5 の蛍光は、微小偏向ミラーアレイ 22 で反射して光路 25 上に進行し、さらに反射ミラー 27 で反射し

てバリアフィルタ 30 により不要なレーザ反射光がカットされ、Cy 5 の蛍光が光検出器 14 に入射する。

【0131】そして、制御部 24 は、光検出器 14 からの信号を蛍光色素 Cy 5 の蛍光の信号として取り込んで蓄積する。

【0132】次に、制御部 24 は、再び 1 画素に対して 3 種類の蛍光色素 FITC、PI、Cy 5 の全ての蛍光の検出が終了したかを判断し、3 種類全ての蛍光検出が終了すれば、X ガルバノミラー 16a により水平方向の次の 1 画素にスポット光を移動させ、上述したのと同様に蛍光の検出を繰り返す。

【0133】すなわちこれ以降、X ガルバノミラー 16a により水平方向に 1 画素毎にスポット光を固定照射し、この水平方向の走査が終了すると、Y ガルバノミラー 16b によりスポット光を 1 画素分だけ垂直方向に走査し、再び X ガルバノミラー 16a により水平方向に 1 画素毎にスポット光を固定照射することを繰り返す。

【0134】そして、1 画素毎にスポット光を固定照射し、A レーザ装置 3 を選択して微小偏向ミラーアレイ 22 における蛍光色素 FITC による蛍光のスポット光の回折径 ϕD ($=1.00 \mu m$) 内の各微小偏向ミラー 23 を角度制御し、次に HeNe-R レーザ装置 4 を選択して微小偏向ミラーアレイ 22 における蛍光色素 PI による蛍光のスポット光の回折径 ϕD ($=1.12 \mu m$) 内の各微小偏向ミラー 23 を角度制御し、次に HeNe-R レーザ装置 5 を選択して微小偏向ミラーアレイ 22 における蛍光色素 Cy 5 による蛍光のスポット光の回折径 ϕD ($=1.28 \mu m$) 内の各微小偏向ミラー 23 を角度制御する。

【0135】そして、制御部 24 は、蛍光色素 FITC による信号と蛍光色素 PI による信号と蛍光色素 Cy 5 による信号とを色分けし、例えばモニターに 1 つの多重染色蛍光画像として表示する。

【0136】このように上記第 3 の実施の形態によれば、上記第 1 の実施の形態と同様に、共焦点ピンホール径の大きさを切り換えるためのモータ等を動力源とした機械的な伝達機構を、半導体プロセスで製造した微小偏向ミラーアレイ 22 の角度切り換えに置き換えたものとなり、駆動部の機械的な摩擦が生ぜず、かつ回折径の有効範囲を制限する手段の径補正又は位置補正の高速化を実現できることは勿論のこと、蛍光色素 FITC と PI *

$$\phi D = 1.22 \times (B \cdot F_c \cdot \lambda) / (NA \cdot F_p) \quad \dots (2)$$

を演算することにより求められる。

【0144】従って、微小素子群制御手段 31 は、対物レンズ 20 又は 40 に切り換えられたとき、微小偏向ミラーアレイ 22 における上記式 (2) により算出された光スポットの回折径 ϕD 内における各微小偏向ミラー 23 の角度を制御して標本 2 からの蛍光を 1 CH 側及び 2 CH 側光検出器 14、15 の配置方向となる光路 25 上に反射させ、かつ上記光スポットの回折径 ϕD 外における

* と Cy 5 とにより 3 重蛍光染色された標本 2 を観察するに、これら蛍光色素 FITC と PI と Cy 5 とに対する各蛍光波長に対応した最適な回折径に設定してその多重染色蛍光画像を取得できる。

【0137】(4) 次に、本発明の第 4 の実施の形態について説明する。なお、図 1 と同一部分には同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

【0138】図 7 は共焦点顕微鏡の構成図である。この共焦点顕微鏡は、対物レンズ 20 又は 40 に切り換えられたときの微小偏向ミラーアレイ 22 における蛍光のスポット光の回折径 ϕD 内の各微小偏向ミラー 23 の角度制御の第 1 の機能と、励起ダイクロイックミラー 13a を別の波長特性を有する励起ダイクロイックミラー 13b 又は 13c に切り換えられたときにそれぞれの取付角度誤差により生じる微小偏向ミラーアレイ 22 上での光スポットの位置ずれを補正する第 2 の機能とを備えたものである。

【0139】対物レンズ 20、40 は、それぞれ倍率 B、開口数 NA が異なるものである。なお、これら対物レンズ 20、40 に限らず、それぞれ倍率 B、開口数 NA が異なる多数の対物レンズが用意されている。

【0140】対物レンズ切換機構 41 は、対物レンズ 20 又は 40 を切り換えて光軸中に配置し、かつ切り換えられた対物レンズ 20 又は 40 の種類を制御部 24 に通知する機能を有している。

【0141】励起ダイクロイックミラー切換センサー 42 は、各励起ダイクロイックミラー 13a、13b 又は 13c の切換動作によって、蛍光の光路中に配置された励起ダイクロイックミラー 13a、13b 又は 13c を検出してその検出信号を制御部 24 に送出する機能を有している。

【0142】上記制御部 24 は、対物レンズ切換機構 41 から切り換えられた対物レンズ 20 又は 40 の種類の通知を受けると、観察する蛍光波長と、切り換えられた対物レンズ 20 又は 40 の倍率 B、開口数 NA とに基づいて微小偏向ミラーアレイ 22 における光スポットの回折径 ϕD を算出する機能を有している。

【0143】この光スポットの回折径 ϕD は、観察する蛍光波長を λ 、共焦点レンズ 21 の焦点距離を F_c 、瞳投影レンズ 17 の焦点距離を F_p 、対物レンズ 20、40 の倍率を B 及び開口数を NA とすると、

$$\phi D = 1.22 \times (B \cdot F_c \cdot \lambda) / (NA \cdot F_p) \quad \dots (2)$$

各微小偏向ミラー 23 の角度を 1 CH 側及び 2 CH 側光検出器 14、15 の配置方向とは異なる光路 26 上に反射するように各微小偏向ミラー 23 の角度を制御する機能を有している。

【0145】なお、メモリ 43 には、観察する蛍光波長 λ 、共焦点レンズ 21 の焦点距離 F_c 、瞳投影レンズ 17 の焦点距離 F_p 、各対物レンズ 20、40 の倍率 B 及び開口数 NA のデータが記憶されている。

【0146】又、上記制御部24は、励起ダイクロイックミラー切換センサー42からの各励起ダイクロイックミラー13a、13b又は13cの切換の検出信号を受け、これら励起ダイクロイックミラー13a、13b又は13cに応じてそれぞれの取付角度誤差により生じる微小偏向ミラーアレイ22上での光スポットの位置ずれを補正する機能を有している。これら励起ダイクロイックミラー13a、13b又は13cに対する微小偏向ミラーアレイ22上での光スポットの位置ずれは、予めメモリ43に記憶されているものとする。

【0147】次に上記の如く構成された共焦点顕微鏡の作用について説明する。

【0148】まず、対物レンズ20又は40に切り換えられたときの微小偏向ミラーアレイ22における蛍光のスポット光の回折径 ϕ D内の各微小偏向ミラー23の角度制御について説明する。

【0149】例えば、制御部24からレーザユニット1の音響光学素子9にArレーザ装置3の選択指令を発すると、この音響光学素子9は、Arレーザ装置3から出力される励起波長488nmのレーザ光を選択し、シングルモードファイバ10に導く。

【0150】この励起波長488nmのレーザ光は、シングルモードファイバ10を伝送してスキャンユニット11に導かれる。そして、このレーザ光は、コリメータレンズ12により平行光に整形され、励起ダイクロイックミラー13aにより反射され、X・Yガルバノミラー16a、16bにより走査され、さらに瞳投影レンズ17を透過し、ミラー18で下方に反射され、結像レンズ19、対物レンズ20を通して標本2上に光スポットとして結像される。

【0151】このとき光スポットは、X・Yガルバノミラー16a、16bのXガルバノミラー16aにより水平方向に往復走査され、次にYガルバノミラー16bにより垂直方向に1画素分走査され、再びXガルバノミラー16aにより水平方向に往復走査されることが繰り返される。

【0152】このように標本2上に走査されたときに発生する蛍光色素FITCによる中心波長520nmの蛍光は、上記照明光路とは逆方向、すなわち対物レンズ20から結像レンズ19、ミラー18、瞳投影レンズ17、X・Yガルバノミラー16a、16bに進み、励起ダイクロイックミラー13aを透過して共焦点レンズ21に入射する。そして、蛍光は、共焦点レンズ21により集光されて微小偏向ミラーアレイ22上に光スポットとして結像する。

【0153】このとき対物レンズ20が光軸にセットされていれば、対物レンズ切換機構41は、対物レンズ20の種類の通知を制御部24に通知する。

【0154】この制御部24は、対物レンズ切換機構41から対物レンズ20の種類の通知を受けると、選択し

た励起波長(488nmにより生じる蛍光の波長 λ)と、共焦点レンズ21の焦点距離 F_c と、瞳投影レンズ17の焦点距離を F_p と、対物レンズ20の倍率 B 及び開口数 NA とに基づいて上記式(2)を演算し、微小偏向ミラーアレイ22における光スポットの回折径 ϕ Dを算出する。

【0155】しかるに、制御部24の微小素子群制御手段31は、対物レンズ20が光軸にセットされているとき、上記式(2)により算出された微小偏向ミラーアレイ22における光スポットの回折径 ϕ D内における各微小偏向ミラー23の角度を制御して標本2からの蛍光を1CH側及び2CH側光検出器14、15の配置方向となる光路25上に反射させ、かつ上記光スポットの回折径 ϕ D外における各微小偏向ミラー23の角度を1CH側及び2CH側光検出器14、15の配置方向とは異なる光路26上に反射するように各微小偏向ミラー23の角度を制御する。

【0156】以上のような微小偏向ミラーアレイ22での各微小偏向ミラー23の角度設定により、標本2のピンポイント面からの蛍光の光スポットは、上記光スポットの回折径 ϕ D内となる各微小偏向ミラーで反射して光路25上に進行し、さらに反射ミラー27で反射して分光ダイクロイックミラー28に入射する。これにより、微小偏向ミラーアレイ22は、反射型の共焦点ピンホールとして作用する。

【0157】分光ダイクロイックミラー28に入射した蛍光色素FITCの蛍光は、ここで反射され、バリアフィルタ29により不要なレーザ反射光がカットされ、FITCの蛍光のみが1CH側光検出器14に入射する。

【0158】制御部24は、1CH側光検出器14からの信号を取り込み、最終的に標本2の蛍光画像を取得する。

【0159】次に、対物レンズ20から対物レンズ40に切り換えられると、対物レンズ切換機構41は、対物レンズ40の種類の通知を制御部24に通知する。

【0160】この制御部24は、対物レンズ切換機構41から対物レンズ40の種類の通知を受けると、選択した励起波長(488nmにより生じる蛍光の波長 λ)と、共焦点レンズ21の焦点距離 F_c と、瞳投影レンズ17の焦点距離を F_p と、対物レンズ40の倍率 B 及び開口数 NA とに基づいて上記式(2)を演算し、微小偏向ミラーアレイ22における光スポットの回折径 ϕ Dを算出する。

【0161】しかるに、制御部24の微小素子群制御手段31は、対物レンズ40に切り換えられたときに、上記式(2)により算出された微小偏向ミラーアレイ22における光スポットの回折径 ϕ D内における各微小偏向ミラー23の角度を制御して標本2からの蛍光を1CH側及び2CH側光検出器14、15の配置方向となる光路25上に反射させ、かつ上記光スポットの回折径 ϕ D外

における各微小偏向ミラー 23 の角度を 1 CH 側及び 2 CH 側光検出器 14、15 の配置方向とは異なる光路 26 上に反射するように各微小偏向ミラー 23 の角度を制御する。

【0162】 以上のような微小偏向ミラーアレイ 22 で各微小偏向ミラー 23 の角度設定により、標本 2 のピンツト面からの蛍光の光スポットは、上記光スポットの回折径 ϕ D 内となる各微小偏向ミラーで反射して光路 25 上に進行し、さらに反射ミラー 27 で反射して分光ダイクロイックミラー 28 に入射する。これにより、微小偏向ミラーアレイ 22 は、反射型の共焦点ピンホールとして作用する。

【0163】 分光ダイクロイックミラー 28 に入射した蛍光色素 FITC の蛍光は、ここで反射され、バリアフィルタ 29 により不要なレーザ反射光がカットされ、FITC の蛍光のみが 1 CH 側光検出器 14 に入射する。

【0164】 制御部 24 は、1 CH 側光検出器 14 からの信号を取り込み、最終的に標本 2 の蛍光画像を取得する。

【0165】 以上のように、使用中の対物レンズの種類を制御部 24 で認識しているので、対物レンズを切り替えた時にも、対物レンズの倍率、NA 及び蛍光波長により決まる回折径の大きさに合う、反射型ピンホールの大きさの制御をすばやく、確実に行うことができる。

【0166】 次に、励起ダイクロイックミラー 13a を別の波長特性を有する励起ダイクロイックミラー 13b 又は 13c に切り換えたときにそれぞれの取付角度誤差により生じる微小偏向ミラーアレイ 22 上での光スポットの位置ずれの補正について説明する。

【0167】 まず最初に音響光学素子 9 で例えば Ar レーザ装置 3 から出力される励起波長 488 nm のレーザ光を選択し、励起ダイクロイックミラー 13a を光路に入れる。このレーザ光はシングルモードファイバ 10 を伝送してスキャンユニット 11 に導かれる。そして、このレーザ光は、コリメータレンズ 12、励起ダイクロイックミラー 13a、X・Y ガルバノミラー 16a、16b、さらに瞳投影レンズ 17、ミラー 18、結像レンズ 19、対物レンズ 20 を通して例えば蛍光色素 FITC に染色された標本 2 上に光スポットとして結像される。*

$$S = 200 \cdot X \cdot \tan 80^\circ \\ = 80 \mu\text{m}$$

となる。なおスポット中心 P2 の位置は予め、メモリ 43 に励起ダイクロイックミラー 13b に対応する位置として記憶されている。

【0174】 またこの時、標本 2 を励起波長 488 nm のレーザ光で励起し、蛍光色素 FITC による中心波長 520 nm の蛍光を発生するので、微小偏向ミラーアレイ 22 上における回折径 ϕ D は、 $100 \mu\text{m}$ となる。

【0175】 従って、制御部 24 の微小素子群制御手段 31 は、微小偏向ミラーアレイ 22 におけるスポット中

* 【0168】 この標本 2 で発生した蛍光色素 FITC による中心波長 520 nm の蛍光は、上記照明光路とは逆方向、すなわち対物レンズ 20 から結像レンズ 19、ミラー 18、瞳投影レンズ 17、X・Y ガルバノミラー 16a、16b に進み、励起ダイクロイックミラー 13a を透過して共焦点レンズ 21 に入射する。そして、蛍光は、共焦点レンズ 21 により集光されて微小偏向ミラーアレイ 22 上に光スポットとして結像する。このように励起ダイクロイックミラー 13a が光路に挿入されているときの微小偏向ミラーアレイ 22 上に結像する光スポットの中心を図 8 に示す。スポット中心を P1 とする。

【0169】 次に、励起ダイクロイックミラー 13a が光路に挿入されている状態から励起ダイクロイックミラー 13b に切り換えると、励起ダイクロイックミラー切換センサー 42 は、切り換えられて蛍光の光路中に配置された励起ダイクロイックミラー 13b を検出してその検出信号を制御部 24 に送出する。

【0170】 この制御部 24 は、励起ダイクロイックミラー切換センサー 42 からの励起ダイクロイックミラー 13b の切換えの検出信号を受け、この励起ダイクロイックミラー 13b に応じてそれぞれの取付角度誤差により生じる微小偏向ミラーアレイ 22 上での光スポットの位置ずれを補正する。

【0171】 すなわち、励起ダイクロイックミラー 13a が光路に挿入されている状態から励起ダイクロイックミラー 13a を 13b に切り換えると、励起ダイクロイックミラー 13a に対する励起ダイクロイックミラー 13b の角度誤差により共焦点レンズ 21 に入射する蛍光の角度が、例えば横方向に約 80° ずれる。

【0172】 従って、微小偏向ミラーアレイ 22 上における蛍光の光スポットの中心位置は、図 8 に示すように励起ダイクロイックミラー 13a が光路に挿入されているときにスポット中心 P1 であったものが、励起ダイクロイックミラー 13b に切り換えることにより、スポット中心 P2 に移動する。

【0173】 励起ダイクロイックミラー 13a と 13b との間隔 S は、共焦点レンズ 21 の焦点距離を例えば 200 mm とすると、

… (3)

心 P2 を中心とする回折径 ϕ D 内 (領域 Q4 内) の各微小偏向ミラー 23 の角度を制御し、かつこれら各微小偏向ミラー 23 で反射した蛍光が 1 CH 側光検出器 14 の配置方向となる光路 25 上に進行させる。

【0176】 これにより、標本 2 のピンツト面からの蛍光は、領域 Q4 内における各微小偏向ミラー 23 で反射して光路 25 上に進行し、さらに反射ミラー 27 で反射して分光ダイクロイックミラー 28 に入射してここで反射され、バリアフィルタ 29 により不要なレーザ光をカッ

トし、FITCの蛍光のみが1CH側光検出器14に入射する。

【0177】制御部24は、1CH側光検出器14からの信号を取り込み、最終的に標本2の蛍光画像を取得する。

【0178】次に、制御部24からの選択指令により音響光学素子9がHeNe-レーザ装置4から出力される励起波長543nmのレーザ光を選択すると共に、励起ダイクロイックミラー13cに切り換えられたとする。

【0179】励起ダイクロイックミラー切換センサー42は、切り換えられて蛍光の光路中に配置された励起ダイクロイックミラー13cを検出してその検出信号を制御部24に送出する。

【0180】この制御部24は、励起ダイクロイックミラー切換センサー42からの励起ダイクロイックミラー13cの切換の検出信号を受け、この励起ダイクロイックミラー13cに応じてそれぞれの取付角度誤差に*

$$S = 200 \cdot X \cdot \tan - 60^\circ \\ = -60 \mu\text{m} \text{ (横方向)}$$

となる。なおスポット中心P3の位置は、予めメモリ43に励起ダイクロイックミラー13cに対応する位置として記憶されている。

【0184】この時、標本2を励起波長543nmの励起レーザ光で励起し、蛍光色素PIによる中心波長580nm付近の蛍光を発生するので、微小偏向ミラーアレイ22上における回折径φDは、112μmとなる。

【0185】従って、上記微小素子群制御手段31は、スポット中心P3を中心とする回折径φD内（領域Q5内）の各微小偏向ミラー23の角度を制御し、かつこれら各微小偏向ミラー23で反射した蛍光が2CH側光検出器15の配置方向となる光路25上に進行させる。

【0186】これにより、標本2のピント面からの蛍光は、領域Q5内における各微小偏向ミラー23で反射して光路25上に進行し、さらに反射ミラー27で反射して分光ダイクロイックミラー28を透過し、バリアフィルタ30により不要なレーザ光をカットし、PIの蛍光のみが2CH側光検出器15に入射する。

【0187】制御部24は、2CH側光検出器15からの信号を取り込み、最終的に標本2の蛍光画像を取得する。

【0188】このように上記第4の実施の形態においては、蛍光波長や対物レンズを切り換えたときの微小偏向ミラーアレイ22における蛍光のスポット光の回折径φD内の各微小偏向ミラー23を角度制御する第1の機能と、励起ダイクロイックミラーを13a、13b又は13cに切り換えたときにそれぞれの取付角度誤差により生じる微小偏向ミラーアレイ22上での光スポットの位置ずれを補正する第2の機能とを備えたので、対物レンズを切り換えたときにも微小偏向ミラーアレイ22にお

*り生じる微小偏向ミラーアレイ22上での光スポットの位置ずれを補正する。

【0181】すなわち、励起ダイクロイックミラー13aが光路に挿入されている状態から励起ダイクロイックミラー13aを13cに切り換えると、励起ダイクロイックミラー13aに対する励起ダイクロイックミラー13cの角度誤差により共焦点レンズ21に入射する蛍光の角度が、例えば横方向に約-60°ずれる。

【0182】従って、微小偏向ミラーアレイ22上における蛍光の光スポットの中心位置は、図8に示すように励起ダイクロイックミラー13aが光路に挿入されているときにスポット中心P1であったものが、励起ダイクロイックミラー13bに切り換わることにより、スポット中心P3に移動する。

【0183】励起ダイクロイックミラー13aと13cとの間隔Sは、共焦点レンズ21の焦点距離を例えば200mmとすると、

…(4)

いて最適な蛍光のスポット光の回折径φDに制御して、反射型の共焦点ピンホールとして作用できる。

【0189】又、励起ダイクロイックミラーを13a、13b又は13cに切り換えたときには、それぞれの取付角度誤差により生じる微小偏向ミラーアレイ22上での光スポットの位置ずれを補正できる。従って、高精度が要求されるピンホールの開閉及び平面内2軸の位置補正と、合計3個の駆動機構を、モータ等を動力源とした機械的な伝達機構を一切必要としない、1つの微小偏向ミラーアレイにより実現でき、駆動部の摩耗が少なく、高い信頼性を得ることができる。又、設計工数の削減や装置の小型化も可能である。

【0190】なお、本発明は、上記第1乃至第4の実施の形態に限定されるものでなく、実施段階ではその要旨を逸脱しない範囲で種々に変形することが可能である。

【0191】さらに、上記実施形態には、種々の段階の発明が含まれており、開示されている複数の構成要件における適宜な組み合わせにより種々の発明が抽出できる。例えば、実施形態に示されている全構成要件から幾つかの構成要件が削除されても、発明が解決しようとする課題の欄で述べた課題が解決でき、発明の効果の欄で述べられている効果が得られる場合には、この構成要件が削除された構成が発明として抽出できる。

【0192】例えば、上記第4の実施の形態は次の通り変形してもよい。すなわち、1CH側及び2CH側光検出器14、15への光を波長毎に分ける複数の切り換え式分光ダイクロイックミラーの後に、各検出チャンネル毎に、共焦点レンズ、微小偏向ミラーアレイを設けた構成にしてもよい。

【0193】図9はかかる切り換え式分光ダイクロイック

ミラーの後に共焦点レンズ、微小偏向ミラーアレイを設けた場合の共焦点顕微鏡の部分構成図である。励起ダイクロイックミラー13a、13b、13cのうち例えば励起ダイクロイックミラー13aを透過した蛍光の光路上には、切り換え式分光ダイクロイックミラー50が配置されている。

【0194】この切り換え式分光ダイクロイックミラー50の透過光路上には、1CH側として共焦点レンズ21aを介して微小偏向ミラーアレイ22aが配置されている。そして、この微小偏向ミラーアレイ22aの反射光路25a上にはバリアフィルタ29を介して1CH側光検出器14が配置されている。

【0195】一方、切り換え式分光ダイクロイックミラー50の反射光路上には、2CH側として共焦点レンズ21bを介して微小偏向ミラーアレイ22bが配置されている。そして、この微小偏向ミラーアレイ22bの反射光路25b上にはバリアフィルタ30を介して2CH側光検出器15が配置されている。

【0196】この場合、分光ダイクロイックミラー50を切り換えたときも、その角度誤差が、微小偏向ミラーアレイ22a又は22b上での光スポットの位置ずれに影響する。従って、各励起ダイクロイックミラー13a、13b、13c、分光ダイクロイックミラー50のいずれか一方又は両方が切り換えられたときに、微小偏向ミラーアレイ22a又は22bにおける光スポットの位置ずれに対する上記位置補正を行うことが必要となる。

【0197】又、例えば、微小素子群は、微小偏向ミラーアレイ22を用いているが、これに限定されるものではない。例えば、微小素子群として液晶を用いてもよい。この場合、マトリックス状の各エレメント（微小素子と定義する）の電極を制御することにより光を透過する微小素子、光を遮断する微小素子を選択制御するものとなる。

【0198】従って、光スポットの領域に位置する微小素子群内の各微小素子の電極を透過状態に、その他の微小素子の電極を遮断状態に制御することにより、液晶を透過した光が光検出器14又は15で検出できるようにし、それ以外のエレメント（微小素子）は光が遮断されて光検出器14又は15で検出されないことになり、透過型の共焦点ピンホール手段として用いることができる。又、液晶においても各エレメントの制御を高速化できる。

【0199】この液晶を用いた微小素子群を上記図1に示す共焦点顕微鏡に適用すると、微小偏向ミラーアレイ22で反射している光路25が、液晶を用いた場合、微小偏向ミラーアレイ22の代わりに使用する液晶を透過した光路になるのは言うまでもない。

【0200】又、微小素子群は、マトリックス状に複数の受光ピクセル（微小素子と定義する）を配置した2次

元CCDを用いてもよい。この場合、光スポットの領域に位置するピクセル群（微小素子群）内のピクセルの受光光量の総和を検出信号として使用し、それ以外のピクセルは電氣的に検出できないようにするか、又は検出してもその検出信号を加算しないのとする。以上により光検出器で検出できるように制御するその他の微小素子の選択、制御を、各々のピクセルの検出信号の取捨選択で行うことができ、上記図1で示した微小偏向ミラーアレイ22の後の光検出器への光路25以降の構成が不要となる。

【0201】又、微小素子群と光検出器とを1つのデバイスで共用できる簡単な構成で顕微鏡を実現できる。なお、上記図1に本変形例を適用させると、微小偏向ミラーアレイ22がCCDに代わり、その後の光路25が必要なくなることは言うまでもない。

【0202】又、微小偏向ミラーアレイ22は、図2に示すように複数の微小偏向ミラー23を2次元マトリックス状に配列したものであるが、微小偏向ミラー23をランダムな位置に配置して群をなすものとしてもよい。

【0203】又、上記第1乃至第4の実施の形態では、蛍光色素により染色された標本2を励起し、その蛍光を共焦点ピンホールを通して観察する共焦点顕微鏡について説明したが、標本2からの透過光、反射光を共焦点ピンホールを通して観察する共焦点顕微鏡についても適用できることは言うまでもない。

【0204】また、本実施形態では標本が蛍光色素で染色された生物系での使用であったが、これに限られるものではなく、例えば工業系でも使用することはできる。

【0205】

【発明の効果】以上詳記したように本発明によれば、駆動部の機械的な摩擦が生ぜず、かつ回折径の有効範囲を制限する手段の径補正又は位置補正の高速化を実現できる共焦点顕微鏡を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係わる共焦点顕微鏡の第1の実施の形態を示す構成図。

【図2】本発明に係わる共焦点顕微鏡の第1の実施の形態における微小偏向ミラーアレイの構成図。

【図3】本発明に係わる共焦点顕微鏡の第1の実施の形態における微小偏向ミラーアレイにおける蛍光の結像される光領域内における各微小偏向ミラーの角度制御を示す図。

【図4】本発明に係わる共焦点顕微鏡の第1の実施の形態における各微小偏向ミラーに入射する蛍光の経路を蛍光が反射する面内で示した側面図。

【図5】本発明に係わる共焦点顕微鏡の第2の実施の形態における微小偏向ミラーアレイにおける蛍光の結像される光領域内における各微小偏向ミラーの角度制御を示す図。

【図6】本発明に係わる共焦点顕微鏡の第3の実施の形

31

態を示す構成図。

【図7】本発明に係わる共焦点顕微鏡の第4の実施の形態を示す構成図。

【図8】本発明に係わる共焦点顕微鏡の第4の実施の形態における微小偏向ミラーアレイ上での光スポットの位置ずれの補正に対する各微小偏向ミラーの角度制御を示す図。

【図9】本発明に係わる共焦点顕微鏡において切り換え式分光ダイクロイックミラーの後に共焦点レンズ、微小偏向ミラーアレイを設けた場合の部分構成図。

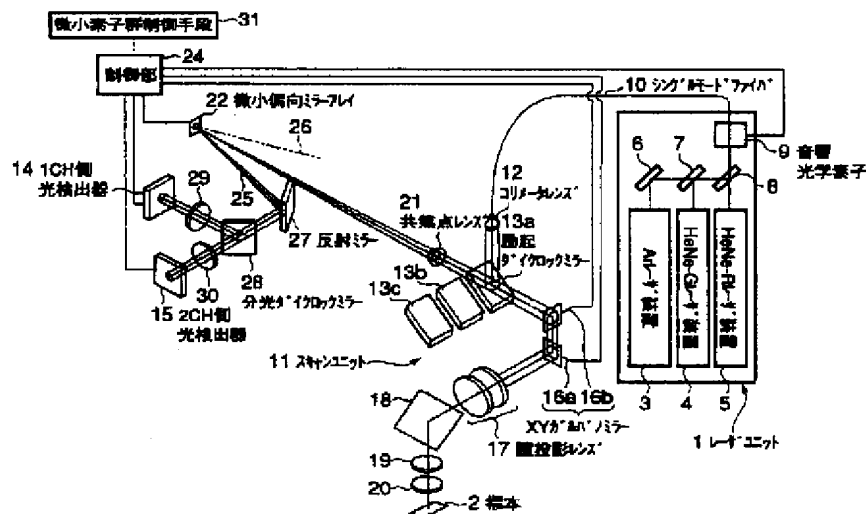
【符号の説明】

- 1：レーザユニット
- 2：標本
- 3：Arレーザ装置
- 4：HeNe-Gレーザ装置
- 5：HeNe-Rレーザ装置
- 6：ミラー
- 7，8：ダイクロイックミラー
- 9：音響光学素子（AOTF）
- 10：シングルモードファイバ
- 11：スキャンユニット

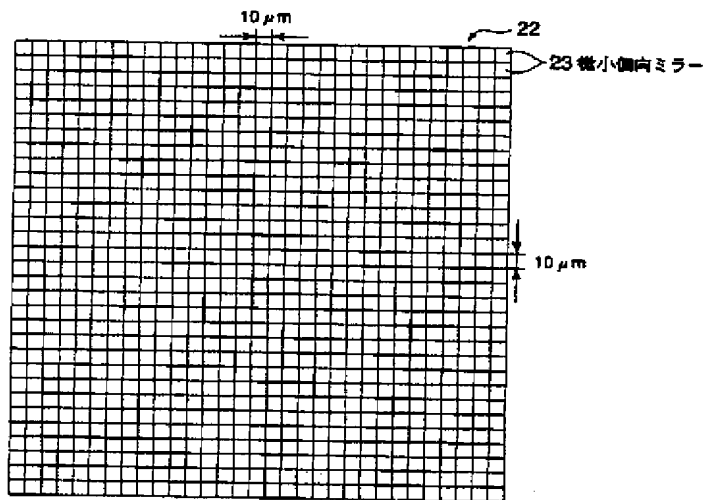
32

- 12：コリメータレンズ
- 13a，13b，13c：励起ダイクロイックミラー
- 14：1CH側光検出器
- 15：2CH側光検出器
- 16a，16b：X・Yガルバノミラー
- 17：瞳投影レンズ
- 18：ミラー
- 19：結像レンズ
- 20：対物レンズ
- 21：共焦点レンズ
- 22：微小偏向ミラーアレイ
- 23：微小偏向ミラー
- 24：制御部
- 27：反射ミラー
- 28：分光ダイクロイックミラー
- 29，30：バリアフィルタ
- 40：対物レンズ
- 41：対物レンズ切換機構
- 42：励起ダイクロイックミラー切換センサー
- 43：メモリ
- 50：切り換え式分光ダイクロイックミラー

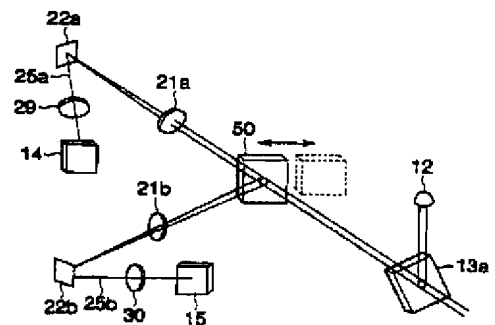
【図1】



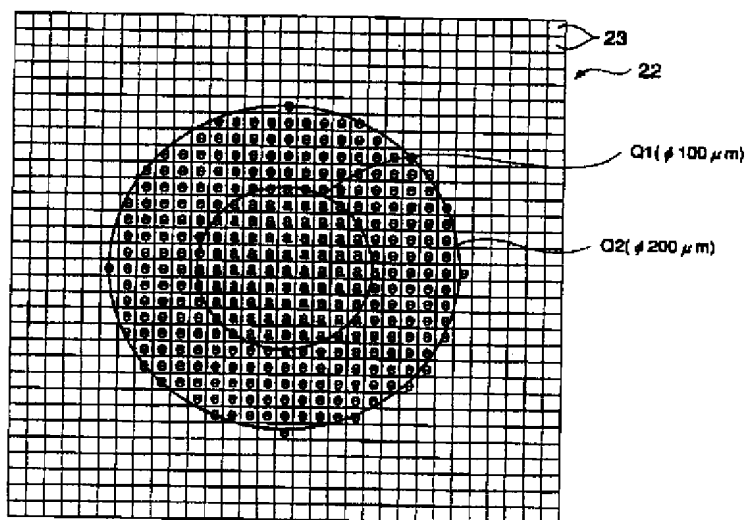
【図2】



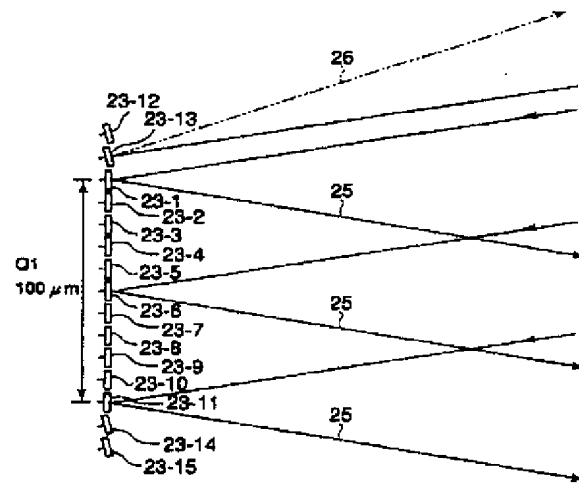
【図9】



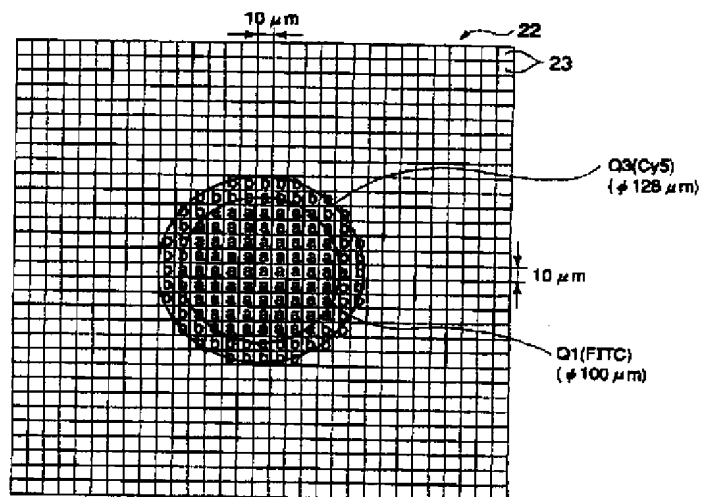
【図3】



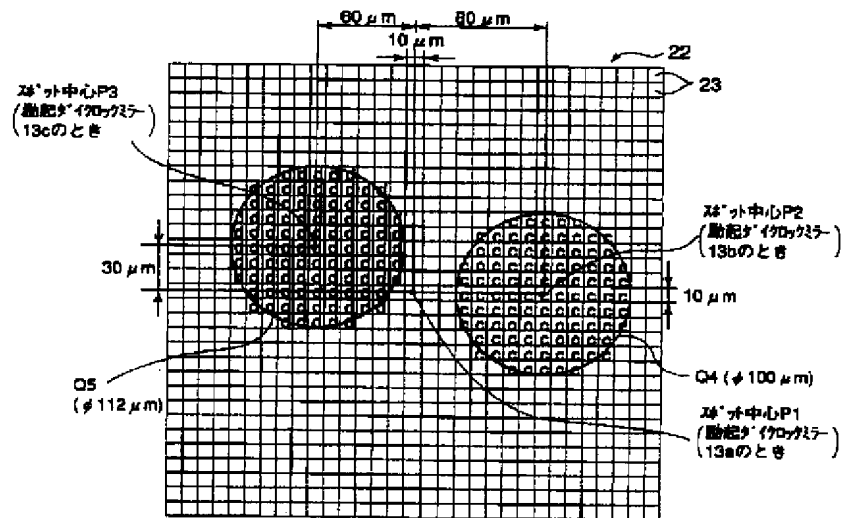
【図4】



【図5】



【図8】



【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第2区分

【発行日】平成19年11月1日(2007.11.1)

【公開番号】特開2002-90628(P2002-90628A)

【公開日】平成14年3月27日(2002.3.27)

【出願番号】特願2000-282695(P2000-282695)

【国際特許分類】

G 0 2 B 21/00 (2006.01)

【F I】

G 0 2 B 21/00

【手続補正書】

【提出日】平成19年9月13日(2007.9.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 2種類以上の蛍光色素で染色された標本からの光を共焦点レンズを通して光検出器により検出する共焦点顕微鏡において、

前記共焦点レンズを介して前記標本と共役な位置に配置された複数の微小素子からなる微小素子群と、

前記各微小素子に対してそれぞれ制御を行い、前記標本から前記共焦点レンズを通して前記微小素子群に結像する光スポットの回折径内となる前記各微小素子からの前記光を前記光検出器に導く微小素子群制御手段と、

前記標本に対して各蛍光色素に対応する励起波長の励起光を選択的に出力できる光源と

前記光源から出力された励起光を走査する走査手段と、

前記走査手段で走査した励起光を標本上に集光する対物レンズとを具備し、

前記光走査手段の走査に同期して前記標本に対して照射する励起光を切り換えることにより、各励起光に対応する夫々の蛍光を時分割で1つの微小素子群を介して検出して1つの画像を取得する場合に、前記微小素子群制御手段は、前記光源からの励起光の切り替えに同期して、前記共焦点レンズを通して前記微小素子群に結像する光スポットの回折径に前記光検出器に前記標本からの光を導く前記微小素子群の各微小素子を調整することを特徴とする共焦点顕微鏡。

【請求項2】 前記微小素子群は、複数の微小偏向ミラーを2次元マトリックス状に配列して構成され、

前記微小素子群制御手段は、前記光スポットを前記光検出器の配置方向に反射するように前記回折径内における前記各微小偏向ミラーの角度を制御し、かつ前記回折径外における前記各微小偏向ミラーの角度を前記回折径内における前記各微小偏向ミラーの角度とは異なる角度に制御する機能を有する、ことを特徴とする請求項1記載の共焦点顕微鏡。

【請求項3】 前記微小素子群制御手段は、前記微小素子群に結像される前記回折径の大きさに応じて、前記光スポットを前記光検出器に導くために制御する前記各微小素子の領域を可変する機能を有することを特徴とする請求項1記載の共焦点顕微鏡。

【請求項4】 前記微小素子群制御手段は、前記微小素子群に結像される前記光スポットの位置ずれに応じて、前記光スポットを前記光検出器に導くために制御する前記各微小素子の中心位置を補正する機能を有することを特徴とする請求項1記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 5】 前記標本と前記微小素子群との間に配置された少なくとも 1 つの光学素子の切り換えにより生じる前記微小素子群上における前記光スポットの位置ずれを補正する機能を有することを特徴とする請求項 4 記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 6】 前記微小素子群制御手段による励起光の切り替えは、前記光走査手段による往復走査の往路と復路の走査に夫々同期することを特徴とする請求項 1 記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 7】 前記微小素子群制御手段による励起光の切り替えは、前記光走査手段による 1 フレーム毎の走査に同期することを特徴とする請求項 1 記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 8】 前記微小素子群制御手段による励起光の切り替えは、前記光走査手段による 1 画素毎の走査に同期することを特徴とする請求項 1 記載の共焦点顕微鏡。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

【課題を解決するための手段】 請求項 1 記載による本発明は、2 種類以上の蛍光色素で染色された標本からの光を共焦点レンズを通して光検出器により検出する共焦点顕微鏡において、前記共焦点レンズを介して前記標本と共役な位置に配置された複数の微小素子からなる微小素子群と、前記各微小素子に対してそれぞれ制御を行い、前記標本から前記共焦点レンズを通して前記微小素子群に結像する光スポットの回折径内となる前記各微小素子からの前記光を前記光検出器に導く微小素子群制御手段と、前記標本に対して各蛍光色素に対応する励起波長の励起光を選択的に出力できる光源と、前記光源から出力された励起光を走査する走査手段と、前記走査手段で走査した励起光を標本上に集光する対物レンズとを具備し、前記光走査手段の走査に同期して前記標本に対して照射する励起光を切り換えることにより、各励起光に対応する夫々の蛍光を時分割で 1 つの微小素子群を介して検出して 1 つの画像を取得する場合に、前記微小素子群制御手段は、前記光源からの励起光の切り替えに同期して、前記共焦点レンズを通して前記微小素子群に結像する光スポットの回折径に前記光検出器に前記標本からの光を導く前記微小素子群の各微小素子を調整することを特徴とする共焦点顕微鏡である。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0017】

請求項 6 記載の本発明は、請求項 1 記載の共焦点顕微鏡であって、前記微小素子群制御手段による励起光の切り替えは、前記光走査手段による往復走査の往路と復路の走査に夫々同期することを特徴としたものである。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0018】

請求項 7 記載の本発明は、請求項 1 記載の共焦点顕微鏡であって、前記微小素子群制御手段による励起光の切り替えは、前記光走査手段による 1 フレーム毎の走査に同期することを特徴とするものである。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

請求項 8 記載の本発明は、請求項 1 記載の共焦点顕微鏡であって、前記微小素子群制御手段による励起光の切り替えは、前記光走査手段による 1 画素毎の走査に同期することを特徴とするものである。